

八幡高原におけるアラゲナツハゼの遺伝変異

平井正志・津呂正人・久保中央

京都府立大学農学部

Genetic Variation of *Vaccinium ciliatum* in Geihoku, Hiroshima Prefecture

Masashi HIRAI, Masato TSURO and Nakao KUBO

Faculty of Agriculture, Kyoto Prefectural University

Kita-Inayazuma, Seika, Kyoto 619-0244

Abstract : DNA polymorphism of *Vaccinium ciliatum* Thunb. was examined to determine the genetic variation in natural populations in Geihoku, Hiroshima. Two related species, *V. sieboldii* and *V. oldhami* were also included in the analysis for comparison. Random amplified polymorphic DNA revealed an extensive DNA polymorphism in the natural population of *V. ciliatum*. Microsatellite polymorphism also supported a wide genetic variation among individuals of *V. ciliatum*. *V. ciliatum* and *V. sieboldii* shared common microsatellite alleles. The results suggest a close relationship between these two species. In contrast, *V. oldhami* is thought to have relatively distant relationships with the above mentioned two species. However, common alleles of microsatellite loci were found between *V. ciliatum* and *V. oldhami*, and this suggests two possibilities. One is natural crossings between these two species. The other is that the two species originally share common alleles in low frequencies because of the genetic relationship.

©2005 Geihoku-cho Board of Education, All rights reserved.

はじめに

アラゲナツハゼ *Vaccinium ciliatum* は福井県高浜町から北九州にかけての主として日本海側に分布し、ツツジ科スノキ属スノキ節 Section Cyanococcus に (北村・村田 1976)、あるいは同属ナツハゼ節 Section Ciliata に (山崎 1989) 分類される。果実が利用される北米原産のブルーベリー *Vaccinium corymbosum* や日本の高山の酸性土壤に分布するクロマメノキ *Vaccinium uliginosum* やクロウスゴ *Vaccinium ovalifolium* ともきわめて近縁である。アラゲナツハゼは主として明るい道路脇、林縁などに分布するが、密閉された林下には少ない。地域によっては個体数が少なくなっており、山口県では絶滅危惧Ⅱ類に、その他、島根県、鳥取県、岡山県、滋賀県、京都府でも希少種や保護の対象とされ、自生地における個体の減少が注目されている。し

かし、広島県芸北町の八幡高原付近ではかなり多くの個体が生育している。一方アラゲナツハゼにごく近縁で、愛知県、静岡県に分布するナガボナツハゼ *Vaccinium sieboldii* は環境省による絶滅危惧Ⅱ類 (VU) に指定され、また両県でも絶滅危惧種に分類されている (愛知県環境部自然環境課 2001)。近縁のブルーベリーでは自家不和合性が知られており、個体間で幅広い遺伝変異があることが知られている (Vander Kloet and Lyrene 1987)。そこで野生集団での遺伝変異を調べる目的で、芸北町に多数自生するアラゲナツハゼのDNA多型を調査した。また近縁であるナツハゼ *Vaccinium oldhami* およびナガボナツハゼのDNA多型についても対照として同様に調査した。

植物材料および分析手法

アラゲナツハゼの葉は芸北町尾崎谷湿原、長者原湿原、東八幡原道路脇、および傍示峠、大佐スキー場内で採取した。ナツハゼ及びナガボナツハゼの採集地はアラゲナツハゼのそれと共に表1に示す。

表1 本研究で分析に用いたサンプル

種名	サンプル番号	採集地
アラゲナツハゼ	A-010	広島県山県郡芸北町 新川溜池
アラゲナツハゼ	A-012	広島県山県郡芸北町 新川溜池
アラゲナツハゼ	A-013	広島県山県郡芸北町 新川溜池
アラゲナツハゼ	A-014	広島県山県郡芸北町 新川溜池
アラゲナツハゼ	A-015	広島県山県郡芸北町 尾崎谷湿原
アラゲナツハゼ	A-017	広島県山県郡芸北町 東八幡原
アラゲナツハゼ	A-018	広島県山県郡芸北町 東八幡原
アラゲナツハゼ	A-019	広島県山県郡芸北町 長者原湿原
アラゲナツハゼ	A-021	広島県山県郡芸北町 傍示峠
アラゲナツハゼ	A-022	広島県山県郡芸北町 傍示峠
アラゲナツハゼ	A-023	広島県山県郡芸北町 傍示峠
ナツハゼ	N-311	三重県安芸郡安濃町 戸島
ナツハゼ	N-312	三重県安芸郡安濃町 戸島
ナツハゼ	N-203	京都府京田辺市 宮津
ナツハゼ	N-010	愛知県渥美郡渥美町
ナツハゼ	N-011	愛知県渥美郡渥美町
ナツハゼ	N-551	岡山県真庭郡八束村 上蒜山
ナガボナツハゼ	F-001	愛知県渥美郡渥美町
ナガボナツハゼ	F-007	愛知県渥美郡渥美町
ナガボナツハゼ	F-024	愛知県渥美郡渥美町
ナガボナツハゼ	F-029	愛知県田原市

ツツジ科の植物はDNA抽出が難しいことが知られている。通常のCTAB法によっては成葉からDNAを抽出することができなかった。そこで採取した葉からDNeasy キット (Qiagen社) によりDNAを抽出した。分析はRandom Amplified Polymorphic DNA (RAPD, 任意増幅DNA多型) 法によった。PCR条件は94℃, 30秒の保温の後, 94℃, 30秒, 40℃ 1分, 72℃ 1分30秒を45回繰り返す。その後72℃で5分保温して反応を終了した。反応産物はアガロースゲル電気泳動で識別した。また信頼性が高く、多くの多型を検出できる方法として知られているマイクロサテライト法も併用した (Goldstein and Schloetterer 1999)。ブルーベリーの発現配列の情報から、マイクロサテライトを含む配列を選び出し、この配列に基づいて、マイクロサテライト領域を増幅するプライマーペア

を作製し、これを用いてPCRを行った。反応条件は94℃、30秒の保温の後、94℃、30秒、50℃ 1分、72℃ 1分30秒を35回繰り返し、その後72℃ 5分の保温して反応を終了した。反応産物の多型はアクリルアミドゲル電気泳動とDNAシーケンサーで分析した。マイクロサテライト座の対立遺伝子は増幅されたバンドの断片長（塩基数）で示した。

結果および考察

RAPD分析

分析結果を図1に示す。それぞれ、10塩基対のプライマーを加え、DNAを増幅したところ、各個体により、異なったパターンが生じた。アラゲナツハゼで明確に増幅されたバンド21本のうち全個体に共通なバンドは7本のみであった。同一の基準での比較ではないが、スイカヤナスなどでは多型を示すバンドの頻度は低い。アラゲナツハゼの種内のバンドの変異は相当大きなものであると想定された (Nunome *et al.* 2001, Hashizume *et al.* 2003)。それぞれのバンドはメンデルの優性の法則によって、遺伝すると考えられることから、個体間で遺伝変異があることが明らかになった。近縁のナツハゼ、ナガボナツハゼについても遺伝変異が考えられることから、これら近縁の3種がどのような関係にあるのかが注目される。しかし、この手法では遺伝的多型の存在は確認できるものの、対立遺伝子の同定が困難である。そこで、より詳細な分析に適するマイクロサテライト領域の多型分析を行った。

マイクロサテライトの分析

ブルーベリー EST配列に基づく10数組のプライマーを試したが、ほとんどの場合、バンドが増幅された。これはアラゲナツハゼとブルーベリーがかなり近縁であり、ゲノムDNA配列に類似性が高いことを示している。アクリルアミドゲル電気泳動ではパターンに差のあることは判別できるが、対立遺伝子の同定はむずかしかった (図1-e,f)。そこでシーケンサーを用いて、より詳細な分析を試みた。アクリルアミドゲルでは複数のバンドを示すものがシーケンサーでは単一のバンドを示す場合もあり、増幅産物の高次構造によるものと判断された。シーケンサーで解析したマイクロサテライト座のうち今回は2組、すなわち2座について遺伝解析した。VCMS-5座では3種で3つの対立遺伝子が認められた。そのうちアラゲナツハゼとナガボナツハゼではVCMS-5²²⁶の出現頻度が極めて高く、1個体を除いてこの対立遺伝子のホモ型であった。しかし、傍示峠の1個体はVCMS-5¹⁹²をヘテロで持っていた。後者 (VCMS-5¹⁹²) はアラゲナツハゼでは極めて希であったが、ナツハゼによく見られる対立遺伝子であった。ナツハゼにはこの他にVCMS-5²⁰²とVCMS-5²²⁶が見られた。岡山県上蒜山のナツハゼではVCMS-5²²⁶が見られたが、これは分析した限りではナツハゼには希であり、アラゲナツハゼに多く見られるものであった。

一方VCMS-4座では多くの対立遺伝子が検出された。アラゲナツハゼとナガボナツハゼではVCMS-4¹⁷⁸、VCMS-4¹⁸⁰、及びVCMS-4¹⁸²の共通した3対立遺伝子が認められた。一方ナツハゼではVCMS-4¹⁸³など多くの対立遺伝子が認められたが、ほとんどの対立遺伝子はナツハゼに特異的であり、アラゲナツハゼやナガボナツハゼと共通な対立遺伝子は上蒜山で採集されたナツハゼ1個体でのみ認められた (表2)。今回用いたマイクロサテライトは2塩基の繰り返し配列を持つ。従ってマイクロサテライトの多型断片は2塩基ずつの違いになるはずである。アラゲナツハゼと

表2 アラゲナツハゼ、ナガボナツハゼ及びナツハゼのマイクロサテライト多型

種	名	サンプル番号	VCMS-4	VCMS-4	VCMS-5	VCMS-5
アラゲナツハゼ		A-010	178	182	226	226
アラゲナツハゼ		A-012	178	178	226	226
アラゲナツハゼ		A-013	178	178	226	226
アラゲナツハゼ		A-014	178	180	226	226
アラゲナツハゼ		A-015	178	178	226	226
アラゲナツハゼ		A-017	178	178	226	226
アラゲナツハゼ		A-018	178	180	226	226
アラゲナツハゼ		A-019	178	180	226	226
アラゲナツハゼ		A-021	178	180	226	226
アラゲナツハゼ		A-022	178	178	226	226
アラゲナツハゼ		A-023	180	182	226	192
ナツハゼ		N-311	183	187	202	192
ナツハゼ		N-312	187	187	202	192
ナツハゼ		N-203	175	183	192	192
ナツハゼ		N-010	183	195	192	192
ナツハゼ		N-011	185	187	192	192
ナツハゼ		N-551	178	193	226	226
ナガボナツハゼ		F-001	178	178	226	226
ナガボナツハゼ		F-007	180	180	226	226
ナガボナツハゼ		F-024	178	180	226	226
ナガボナツハゼ		F-029	180	182	226	226

注：対立遺伝子は増幅断片の塩基数で表した。対立遺伝子の同定は電気泳動パターンからではなく、シーケンサーによる分析に基づいた。斜体は主としてナツハゼに見られる対立遺伝子を表す。

ナガボナツハゼでは主として偶数塩基対のDNA断片がナツハゼでは奇数塩基対の断片が増幅されたことはナツハゼの持つ対立遺伝子とアラゲナツハゼやナガボナツハゼの持つ対立遺伝子が塩基の繰り返し数のみでなく、周辺配列の違いも含んでいるものと考えられる。この点については現在解析中である。上蒜山で採集されたナツハゼ (N-551) や傍示峠のアラゲナツハゼ (A-023) が雑種起源であるのか、あるいは両種は近縁であり、共通の祖先から進化したと想定されるため、元々低い頻度で両種が共通の対立遺伝子をもっているのかについては今後分析遺伝子座数を増やして検討する余地がある。

今回の分析は限られた個体数の分析ではあるが、対立遺伝子の頻度からアラゲナツハゼとナガボナツハゼが互いに遺伝的に近縁であり、ナツハゼは上記2種とやや遺伝的にやや離れていることが推定できる結果となった。この点についてはさらに個体数とマイクロサテライト座数を増やして検討したい。さらにアラゲナツハゼは福井県から北九州にまで分布するとされている。筆者は芸北町の他、京都府北部海岸 (京丹後市) および、岡山県蒜山 (八束村) でいくつかの個体を確認している。また兵庫県と鳥取県の県境の氷ノ山にも分布するという。このように分布が広い

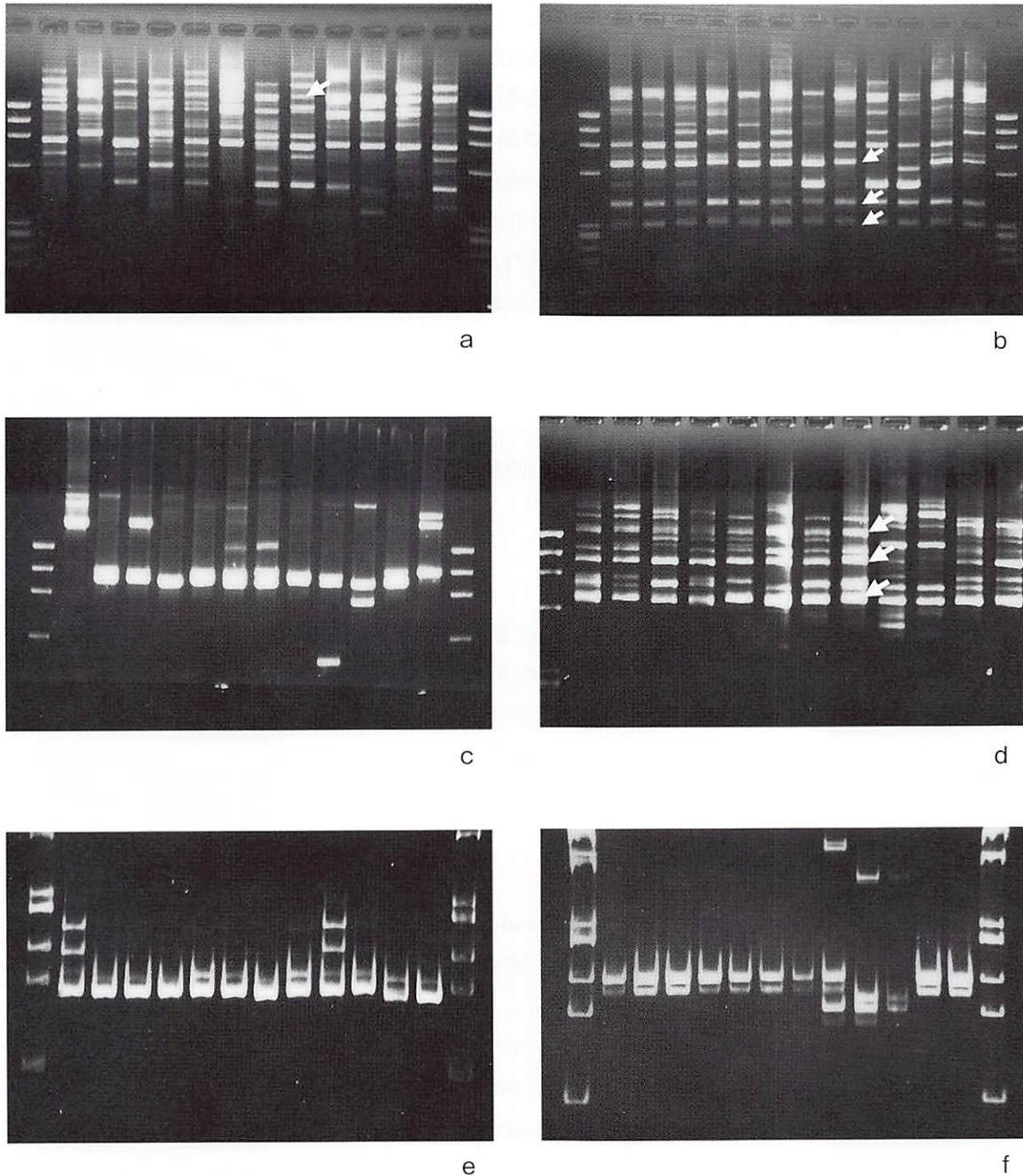


図1 アラゲナツハゼ、ナツハゼ、ナガボナツハゼのDNA多型

左から分子マーカー (ϕ X-174のHaeIII切断断片), A-010, A-012, A-013, A-017, A-018, A-019, A-022, A-023, N-311, N-312, F-001, F-007, 分子マーカー (ϕ X-174のHaeIII切断断片)

ランダムプライマーを用いた増幅産物 (4 a ~ 4 d) はアガロースゲル電気泳動で, VCMSプライマーを用いた増幅産物 (4 e 及び 4 f) はアクリルアミドゲル電気泳動によりパターンを確認した.

a : OPAL-02; 5'-AGCCGTTTCAG-3'を用いた増幅パターン, b : OPAL-14; 5'-TGGTGCACTC-3'を用いた増幅パターン, c : OPAK-06; 5'-TCACGTCCCT-3'を用いた増幅パターン, d : OPAG-20; 5'-TGCGCTCCTC-3'を用いた増幅パターン, e : VCMS4プライマーを用いた増幅パターン, f : VCMS5プライマーを用いた増幅パターン

aからdのRAPDで分析したアラゲナツハゼ全個体に共通なバンドを矢印で示す.

ため、遺伝変異は今回調査した芸北町内での遺伝変異より、かなり広いことが考えられる。今後このような個体の変異を調べ、アラゲナツハゼ遺伝変異の全体像を明らかにしたい。また近縁のナガボナツハゼについても遺伝変異を調べ、絶滅危惧種の保護のための指針を明らかにしたい。

アラゲナツハゼとナガボナツハゼは形態的に類似しており(山崎 1989, 北村・村田 1976)、今回の遺伝解析でも多数の共通な対立遺伝子が確認された。両種は遺伝的にごく近縁であると考えられる。しかし、分布は前者が福井県以北の日本海岸にかぎられ、瀬戸内側には分布しない。また後者は愛知県東部と静岡県西部の太平洋側のごく限られた地帯に分布する。なぜこのような分布をしているのかはきわめて興味深い。遺伝変異の解析からこの分布に関する何らかの示唆をあたえる情報が得られる可能性がある。

絶滅を危惧される種や希少種の保存のために、近年他の生育地域からの移植や、他の場所への移植が行われている。しかし、このような場合にも生育域ごとの遺伝変異を把握して行う必要がある。今回用いた手法はこのような場合の遺伝的多様性評価にも用いることができよう。

謝 辞

アラゲナツハゼを採集するにあたり、芸北 高原の自然館の白川勝信博士に親切な指導をいただいた。また広島県芸北地方事務所林務第一課の方々には採集の便宜をはかっていただいた。また、ナガボナツハゼの採集にあたり、渥美自然の会の大羽康利氏、豊橋ボタニスト倶楽部の八木将勝氏にご協力をいただいた。これらの方々には深く感謝する。

摘 要

1. 芸北町八幡高原周辺のアラゲナツハゼのRandom Amplified Polymorphic DNA及びマイクロサテライト多型を調べた。比較のため、ナガボナツハゼおよびナツハゼも同時に分析した。
2. アラゲナツハゼは個体間に大きな変異があることがRAPD分析から明らかになった。マイクロサテライト多型の分析によるとアラゲナツハゼとナガボナツハゼは比較的類似しており、ナツハゼは上記2種とやや異なる対立遺伝子の組成を持つと考えられた。
3. アラゲナツハゼは福井県から北九州まで分布するとされている。さらに多くの個体を分析することにより、種内の遺伝変異を知ることができ、ナガボナツハゼとの類縁関係も明らかになることであろう。

参 考 文 献

- Vander Kloet, S. P. and P. M. Lyrene 1987 Self-incompatibility in diploid, tetraploid, and hexaploid *Vaccinium corymbosum*. Can. J. Bot. 65: 660-665
- Goldstein, D. B. and C. Schloetterer eds. 1999 Microsatellites -evolution and applications-Oxford University Press, Oxford
- 山崎 敬 1989 ツツジ科 日本の野生植物 佐竹義輔・原 寛・亘理俊次・富成忠夫 (編) 木本II 平凡社 122-156
- 北村四郎・村田 源 1976 原色日本植物図鑑 木本編 I 保育社 401pp.
- 愛知県環境部自然環境課 2001 レッドデータブックあいち 植物編 2001, 714pp.
- Hashizume, T., I. Shimamoto and M. Hirai 2003 Construction of a linkage map and QTL analysis of horticultural traits for watermelon (*Citrullus lanatus* (THUNB.) Matum & Nakai) using RAPD, RFLP and ISSR markers. Theor. Appl. Genet. 106: 779-785
- Nunome, T., K. Ishiguro, T. Yoshida and M. Hirai 2001 : Mapping of fruit shape and color development traits in eggplant (*Solanum melongena* L.) based on RAPD and AFLP markers. Breeding Science 51: 19-26

2004年9月21日受付：2005年1月11日受理

図 版 1

- | | |
|----------------------|--------|
| A : アラゲナツハゼ自生の景観 | 新川溜池周辺 |
| B : アラゲナツハゼ (花穂の伸長期) | 八幡高原 |
| C : アラゲナツハゼ (果実成熟期) | 八幡高原 |

图 版 1

